



TITLE:

Elucidation of subcellular regulation of voltage-dependent calcium channel functions via β subunit interacting molecules(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Mitsuru, Hirano

CITATION:

Mitsuru, Hirano. Elucidation of subcellular regulation of voltage-dependent calcium channel functions via β subunit interacting molecules. 京都大学, 2017, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2017-07-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20633>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2018-07-23に公開; 許諾条件により要旨は2017-10-23に公開

京都大学	博士 (工学)	氏名	平野 満
論文題目	Elucidation of subcellular regulation of voltage-dependent calcium channel functions via β subunit interacting molecules (電位依存性 Ca^{2+} チャネル β サブユニット相互作用タンパク質による、細胞内局所的な Ca^{2+} チャネル機能調節機構の解明に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>Ca^{2+}は細胞内 2 次メッセンジャーとして、種々の細胞応答・生理機能に重要な役割を担っている。特に、神経細胞においては、膜電位の脱分極に応答した Ca^{2+}流入を担う電位依存性 Ca^{2+}チャネル (VDCC) が、神経伝達物質の放出や神経活動依存的な遺伝子の発現を制御している。最近の研究により、VDCC は細胞内局所に異なる分子複合体を形成し、その機能に多様性を生み出していることが明かとなってきた。しかし、その制御を担う分子機構については未解明な点が多い。本論文では VDCC β サブユニット相互作用タンパク質に着目し、細胞内局所的な VDCC 分子複合体の機能を解析することで、新たな神経機能を制御する分子メカニズムと、その生理学的意義をを解明した結果をまとめており、3 章からなっている。</p> <p>序論では、形質膜越えの Ca^{2+}流入によって惹起される生理応答、それを担うイオンチャネルに関する先行研究、ならびに本研究の意義等がまとめられている。</p> <p>第 1 章では、シナプス前終末のアクティブゾーンにおいて形成される VDCC -Rab3-Interacting Molecule (RIM)タンパク質複合体が、多点相互作用により VDCC の活性を精密に制御していることを見出した。これまでに、RIM が β サブユニットと相互作用し、VDCC の電位依存的な不活性化を抑制することで持続した Ca^{2+}流入を可能とすること、シナプス小胞と VDCC の距離を規定することは明らかとなっていた。RIM が VDCC α_1 サブユニット C 末端領域の PDZ 結合モチーフに結合することも報告されていたが、それを含む多点相互作用の生理的意義は未解明であった。本章では、α_1 サブユニット (Cav2.1) の C 末端領域における選択的スプライシングに着目し、共免疫沈降法を用いて、Cav2.1 の C 末端に存在する exon44 および exon47 のコード領域と α-RIM とが相互作用することを見出している。電気生理学的手法を用いた解析から、exon44 と exon47 を共に欠損したバリエーションにおいても顕著な RIM の不活性化抑制効果が確認できること、exon47 によってコードされる領域と RIM2α との相互作用によって RIM2α の有する不活性化抑制効果が増大することを明らかにした。Cav2.1 の C 末端領域の長さを変えた変異体を用いた解析から、RIM2α との相互作用に重要な 17 アミノ酸配列を同定し、この配列が RIM2α の C₂B ドメインを含む C 末端領域と相互作用することも見出している。本成果は、RIM の不活性化抑制効果には β サブユニットとの結合が必須であり、α_1 サブユニット C 末端領域との相互作用が修飾的な役割を担っていることを示唆している。Cav2.1 をコードする遺伝子の変異によって発症する難治性運動失調患者の小脳では、Cav2.1 の C 末端領域におけるスプライシングバリエーションの発現量異常が報告されており、RIM と結合可能なバリエーションの発現量が顕著に増加することがわかっているが、以上の結果から RIM による VDCC チャネル機能制御の破綻と病態発症との関連が示唆され、病態発症機序の分子機構解明につながる知見を得た。</p> <p>第 2 章では、形質膜に発現する β サブユニットが、VDCC を介した細胞外</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	平野 満
<p>からの Ca^{2+}流入を感知して形質膜から解離することを見出した。β サブユニットは、神経細胞の電氣的活動によって核内に移行し、遺伝子の発現調節を担うことが明らかにされているが、その核移行メカニズムの詳細は明らかにされていなかった。本章では、全反射顕微鏡を用いた形質膜近傍特異的なイメージングによって、脱分極刺激によって β サブユニットが形質膜から解離すること、細胞外溶液の Ca^{2+}除去、および VDCC のブロッカーである Cd^{2+}の添加によって、この現象が阻害されることを明らかにした。β サブユニットの N 末端領域または C 末端領域を欠損させた変異体は、核内への集積が無くなることが過去の検討から明らかになっているが、本実験手法を用いた解析からは、これら変異体の形質膜への発現および脱分極刺激に応答した形質膜からの解離は正常に機能していることが明らかになった。以上の結果は、β サブユニットの形質膜から解離と、解離した β サブユニットの核内への移行は異なる機構により制御されていることを示唆している。本成果は、β サブユニットによる遺伝子発現の時間的・空間的な制御の理解に重要であり、既に報告された機構とは異なる新たな神経遺伝子発現制御機構である。</p> <p>第 3 章では、ラット小脳の細胞核画分において β サブユニットが形成する新規分子複合体を同定した。発達期（生後 2～3 週齢）のマウス・ラット小脳から生化学的手法を用いて核画分を抽出し、β サブユニットが核内に存在していることを明らかにした。共免疫沈降法を用いて、核内 β サブユニットが形成するタンパク質複合体を精製し、質量分析によって相互作用タンパク質を同定した。同定したタンパク質の一つである HSC70 と β サブユニットとの結合が、Ca^{2+}、ATP、ADP 濃度依存的に結合力を変化させることも明らかにしている。これらの結果は、核内 β サブユニット分子複合体が神経活動と同期して動的に機能していることを示唆している。本成果は、β サブユニットを中心とした神経活動依存的な遺伝子発現制御機構の解明、並びに神経疾患発症機序解明への手掛かりとなる。</p> <p>結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p> <p>以上、本論文は、細胞内局所的な VDCC β サブユニットを中心とした複合体の機能に関する解析を行い、神経機能の新たな分子制御メカニズムを明らかにした。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、神経活動依存的な神経伝達物質の放出や遺伝子発現を可能とする分子機構に関して、電位依存性 Ca^{2+} チャネル(VDCC) β サブユニット相互作用タンパク質を切り口に追究した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. シナプス前終末のアクティブゾーンにおいて形成される VDCC-Rab3-Interacting Molecule (RIM)タンパク質複合体が、多点による相互作用を介して精密に VDCC の活性を制御していることを見出した。VDCC α_1 サブユニットの選択的スプライシングバリエーションに着目し、RIM の有する VDCC の不活性化抑制効果には、 β サブユニットと RIM との相互作用が必須であること、 α_1 サブユニットの細胞内 C 末端領域と RIM との相互作用がその効果を増大させることを明らかにした。
2. 形質膜に発現する β サブユニットが、脱分極刺激によって形質膜から解離することを見出した。細胞外溶液の Ca^{2+} 除去によってこの現象が阻害されたことから、 β サブユニットは、脱分極刺激によって惹起された細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を感知して形質膜から解離することを明らかにした。
3. ラット小脳の細胞核画分において β サブユニットが形成する新規分子複合体を、共免疫沈降法と質量分析を組み合わせた手法によって同定した。同定した核内 β サブユニット相互作用タンパク質の一つである HSC70 と β サブユニットとの結合が、 Ca^{2+} 、ATP、ADP 濃度依存的に結合力を変化させることを明らかにした。

以上、本論文は、神経活動依存的な細胞応答・生理機能を担う新規分子メカニズムを提唱し、生理学的・病理学的に重要な知見を述べたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 6 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。